

明 細 書

蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法

技術分野

- [0001] 本発明は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法に関するものである。

背景技術

- [0002] 近年、遺伝子情報を医療などの分野に有効に利用するための取り組みが活発化しており、その基礎技術として遺伝子を構成する蛋白質の構造を解析する努力が行われている。この蛋白質の構造解析は、蛋白質を構成するアミノ酸が3次元の線状に連なった立体構造を特定するものであり、X線結晶構造解析などの方法によって行われる。
- [0003] このような蛋白質の構造解析を行うためには、まず解析対象の蛋白質を結晶化することが求められ、この蛋白質結晶化の方法として蒸気拡散法が知られている。この方法では、結晶化対象の蛋白質を含む蛋白質溶液から蒸発する溶媒成分を同一容器内に収容された結晶化溶液によって吸収させることにより、蛋白質溶液を過飽和状態に保って結晶を徐々に生成させる。
- [0004] 結晶化を促進させるための結晶生育条件は現状では理論的に解明されていない。そのため、各種の条件を変えながら多数の試験を系統的に実行した結果から最良の条件を求めるスクリーニングの手法が用いられている。従来は、対象となる蛋白質溶液を各種の結晶生育条件下で、すなわち前述の結晶化溶液の種類・濃度や生育温度を変化させた幾通りもの条件下で、試験を反復実行する必要があった。
- [0005] このような試験は、蛋白質溶液および結晶化溶液を収容した結晶化用マイクロプレートなどの結晶化容器を特定温度に設定された恒温室内に保管し、結晶化の有無や進行度合いを時間経過に伴って観察することによって行われる。
- [0006] この蛋白質結晶検出を目的とした観察作業は多くの手間と時間がかかる作業である。そこで、上記の観察作業を効率よく行うため、例えば、日本特許公開公報2004-323336号には、試験担当者が顕微鏡視野内で蛋白質溶液を目視観察すること

によって結晶化の進行状況をデータ化し記録する作業を画像認識によって行う蛋白質結晶検出装置が提案されている。この蛋白質結晶検出装置においては、観察対象の蛋白質溶液をカメラで撮像した画像を認識処理することにより、蛋白質結晶の特徴部分を検出するようにしている。

- [0007] しかしながら、上記従来技術においては、溶液中の蛋白質結晶を精度良く検出する上で、次のような課題があった。すなわち蒸気拡散法による結晶生成過程においては、蛋白質溶液中には結晶化に至らなかった沈殿物などの固形異物が蛋白質結晶とともに存在する。ところが、上述の蛋白質結晶観察装置では、検出対象の蛋白質結晶と結晶には至らないまま固化した沈殿物などの非結晶生成物とを画像上で明確に識別することが困難なため、蛋白質結晶の検出精度が十分には得られない場合があった。

発明の開示

- [0008] 本発明は、蛋白質結晶を高い精度で検出できる蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法を提供することを目的とする。
- [0009] 本発明の蛋白質結晶検出装置は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置であって、観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージと、観察ステージにおいて蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込むカメラと、カメラによって取り込まれた複数のレイヤー画像を記憶する観察画像記憶部と、観察画像記憶部に記憶された各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成部と、結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報をレイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出部と、各レイヤー画像単独のレイヤー情報および隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係に基づいて、蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定部とを備える。
- [0010] 本発明の蛋白質結晶検出方法は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法であって、観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージにおいて蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に

撮像して複数のレイヤー画像を取り込む画像取込工程と、取り込まれた複数のレイヤー画像を記憶する画像記憶工程と、各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程と、結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報をレイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出工程と、各レイヤー画像単独のレイヤー情報および隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係に基づいて、蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定工程とを含む。

- [0011] 本発明によれば、蛋白質溶液を複数の断面で撮像して取り込まれた各レイヤー画像から生成した結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報をレイヤー画像毎に求め、各レイヤー画像単独のレイヤー情報および隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係に基づいて蛋白質結晶の生成状況を判定することにより、蛋白質結晶とその他の生成物とを精度良く識別して、蛋白質結晶を高い精度で検出することができる。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]図1は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の斜視図である。
[図2]図2は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の透視斜視図である。
[図3]図3は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の断面図である。
[図4]図4は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの斜視図である。
[図5]図5は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図である。
[図6A]図6Aは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の観察部の部分断面図である。
[図6B]図6Bは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの拡大部分断面図である。
[図7]図7は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図である。
[図8]図8は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を示す

ブロック図である。

[図9]図9は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の処理機能を示す機能ブロック図である。

[図10]図10は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置における観察動作のフロー図である。

[図11]図11は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法を示すフロー図である。

[図12]図12は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法における結晶化判定処理のフロー図である。

[図13A]図13Aは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図である。

[図13B]図13Bは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図である。

[図14]図14は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー画像を示す図である。

[図15]図15は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像を示す図である。

[図16]図16は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像(マスク処理)を示す図である。

[図17]図17は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー細線化画像を示す図である。

[図18]図18は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像(ノイズ除去)を示す図である。

[図19]図19は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー2値化画像を示す図である。

[図20A]図20Aは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー2値化画像を示す図である。

[図20B]図20Bは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー2

値化画像を示す図である。

[図21A]図21Aは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー2値化画像を示す図である。

[図21B]図21Bは本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー2値化画像を示す図である。

符号の説明

- [0013] 6 結晶化プレート
 - 6a ウェル
 - 6b 液保持部
- 9 観察部
 - 9b 観察ステージ
- 10 カメラ
- 12 結晶化溶液
- 13 蛋白質溶液
 - 13a 蛋白質結晶
- 21b 観察画像記憶部
- 34 レイヤー情報抽出部
- 42 結晶特徴画像生成部
- 43 結晶化判定部

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 次に本発明の実施の形態について図面を参照して説明する。
- [0015] まず図1、図2、図3を参照して、本発明の蛋白質結晶検出装置の全体構造を説明する。蛋白質結晶検出装置1は、蒸気拡散法により蛋白質溶液内で生成した蛋白質結晶を検出するために使用される専用の検出装置である。
- [0016] 図1、図2に示すように、蛋白質結晶検出装置1は、箱形状の恒温室2内にストレージ部5、搬送ユニット7および観察部9を配置した構成となっている。恒温室2は内部雰囲気を設定温度に保持する温調機能を備える。図1に示すように、恒温室2の前面には、内部アクセス用の扉3a、前面からの操作・点検用の小扉3bおよび内部点検用

の窓2b、表示パネルと操作・入力部とが一体となったいわゆるタッチパネル型の制御パネル4が配設されている。そして、恒温室2の側面には観察対象を内部へ搬入するための搬入口2aが設けられている。搬入口2aは、搬入口開閉機構(図示省略)によって開閉自在となっている。

[0017] 次に図2、図3を参照して、恒温室2の内部構造を説明する。恒温室2の内部には、奥側壁面に沿って縦型棚形状のストレージ部5が配置されている。ストレージ部5は棚状に仕切られた複数の収納部5aを備えており、収納部5aには結晶化用のマイクロプレート6(以下、単に「結晶化プレート6」と略記する)が1つだけ収納される。結晶化プレート6は、蛋白質溶液中の蛋白質を結晶化させるために用いられる結晶化容器である。

[0018] ストレージ部5の前面には搬送ユニット7が配置されている。搬送ユニット7は、Xテーブル7X、Yテーブル7Y、Zテーブル7Z、回転ヘッド7R、プレート保持ヘッド8を備えている。Xテーブル7Xは、床面に水平姿勢でX方向(ストレージ部5に平行な方向)に配設されている。Xテーブル7Xに立設されたZテーブル7Zには、Yテーブル7Yが水平姿勢で装着されている。Yテーブル7Yには回転ヘッド7Rが装着されており、回転ヘッド7Rの回転軸にはプレート保持ヘッド8が装着されている。Xテーブル7X、Yテーブル7Y、Zテーブル7Zを駆動することにより、プレート保持ヘッド8はストレージ部5の前面でX、Y、Z方向に移動する。また、回転ヘッド7Rを駆動することにより、保持ヘッド8の水平方向の向きを変更することができる。

[0019] そしてこのXYZ方向の移動により、プレート保持ヘッド8は搬入口2aから搬入される結晶化プレート6をアーム8aによって挟んで保持し、ストレージ部5の指定された収納部5aに収納する。収納部5aで所定時間保持された結晶化プレート6は、プレート保持ヘッド8によって保持され、観察部9まで搬送される。搬送ユニット7は、結晶化プレート6をストレージ部5と観察ステージ9bとの間で搬送する搬送手段となっている。

[0020] 観察部9は基台9a上に立設されたフレーム9cに、観察ステージ9bを水平姿勢で装着し、観察ステージ9bの上方にカメラ10を配置した構成となっている。観察ステージ9bにはプレート保持ヘッド8によって搬送された結晶化プレート6が載置され、セットされる。観察ステージ9bに備えられたXYZ移動機構を駆動することにより、結晶化プ

プレート6はX, Y, Z方向に移動する。そしてカメラ10は、観察ステージ9bにセットされた結晶化プレート6の蛋白質溶液を観察して画像データに取り込む。

- [0021] 図4, 図5を参照して、結晶化プレート6について説明する。図4に示すように、結晶化プレート6には複数のウェル6aが格子状に形成されている。ウェル6aは、円形の凹部の中心に円柱状の液保持部6bが設けられたいわゆるカルデラ状の液体収納用の凹部である。ウェル6a内には、結晶化の対象となる試料、すなわち結晶化対象の蛋白質を含んだ蛋白質溶液13と、結晶化に用いられる結晶化溶液12とが分注される。
- [0022] 図5はこれらの試料を収容した1つのウェル6aの断面を示している。ウェル6a内では、液保持部6bの頂部に設けられたポケット6d内に液滴状の蛋白質溶液13が載置状態で保持されており、液保持部6bを囲むリング状の貯液部6cには、結晶化溶液12が貯溜されている。後述するように結晶化の開始に際しては、液保持部6bに保持された蛋白質溶液13に所定量の結晶化溶液12を貯液部6cから取り出して分注して混合した後、各ウェル6a上面に密封用のシール部材14が貼着される(図4参照)。なお、図4では、透明なシール部材14を用いている。
- [0023] この状態の結晶化プレート6を所定の温度雰囲気下で保管することにより、蛋白質溶液13中の溶媒成分を蒸発させる。溶媒成分の蒸発により蛋白質溶液13の蛋白質濃度が過飽和状態にまで高められ、蛋白質結晶が生成される。このとき、蛋白質溶液13から蒸発する溶媒と結晶化溶液12に吸収される蒸気とが平衡状態を保ちながら蛋白質溶液13からの溶媒の蒸発が緩やかに進行することにより、安定した結晶生成が行われる。
- [0024] 観察部9はこのような結晶生成過程の結晶化プレート6を観察することにより、各ウェル6aにおける蛋白質結晶の有無や結晶化の度合いを検出する。すなわち、図6Aに示すように、観察ステージ9bにセットされた結晶化プレート6をカメラ10の下方に水平移動させて、観察対象のウェル6a内の液保持部6bをカメラ10の撮像光軸に位置合わせする。さらに、観察ステージ9bを昇降させてウェル6a内における撮像対象の断面位置をカメラ10の合焦レベルfに合わせる。そして下方の照明装置11から照明光を照射した状態で、カメラ10によって結晶化プレート6を撮像することにより、結晶化プレート6に保持された蛋白質溶液のレイヤー画像(layer image、図14参照)が

取り込まれる。

- [0025] このカメラ10による撮像において、観察ステージ9bのZ位置を調整することにより、ウェル6aの凹部内に保持された蛋白質溶液13内における任意の水平断面の画像を取得することができる。すなわち観察ステージ9bを所定ピッチで合焦方向(Z方向)に移動させながら、カメラ10で蛋白質溶液13を撮像することにより、図6Bに示すように、蛋白質溶液13において合焦方向の位置が異なる複数の水平断面を示すレイヤーL1, L2, L3, L4, L5の画像(以下、「レイヤー画像」と略称する。)が断面毎に取り込まれる。すなわち、カメラ10は、観察ステージ9bにおいて蛋白質溶液13を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像し、各断面における画像を示す複数のレイヤー画像を取り込む。
- [0026] なお、図4、図5は、結晶生成過程において蛋白質溶液13を載置状態で下方から支持するシッティングドロップ(sitting-drop)法を用いた蒸気拡散法において用いられる結晶化プレート6の例を示している。これ以外にも、図7に示すようなウェル形状の結晶化プレート60を使用してもよい。この結晶化プレート60は、蛋白質溶液13の液滴を垂下状態で保持するハンギングドロップ(hanging-drop)法において用いられる。
- [0027] この例では、ウェル60Aは結晶化溶液12を貯溜する貯液部を有するのみで液保持部を有していない。結晶化対象の蛋白質溶液13の液滴(所定量の結晶化溶液12が混合されたもの)は、ウェル60Aを閉塞するガラス板14Aの裏面に垂下状態で保持される。すなわち蛋白質溶液13が滴下されたガラス板14Aを反転して、結晶化溶液12が分注されたウェル60Aを塞ぐように貼着してウェル60Aを密封する。
- [0028] 次に、図8を参照して、蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を説明する。図8において、蛋白質結晶検出装置1は通信インターフェイス17を備える。通信インターフェイス17は、LANシステム16を介して蛋白質結晶検出装置1内部の制御処理を行う処理部20と、上位制御部であるホストコンピュータ15との制御信号の授受を行う。
- [0029] 処理部20は、データ記憶部21に記憶された各種データに基づいて、プログラム記憶部22に記憶された各種処理プログラムを実行することにより、後述する各種動作および処理機能を実現する。ここでは、プログラム記憶部22には、結晶検出プログラ

ム22a、観察動作プログラム22bが記憶されており、これらのプログラムを実行することにより、後述する蛋白質溶液の観察動作および蛋白質溶液中の蛋白質結晶検出処理が行われる。

- [0030] データ記憶部21は、処理画像記憶部21a、観察画像記憶部21b、結晶化情報記憶部21c、ストレージ情報記憶部21d、レイヤー情報記憶部21eおよび結晶判定基準記憶部21fを備えている。
- [0031] 処理画像記憶部21aは、蛋白質結晶検出処理において各種の処理が行われた後の処理画像を記憶する。
- [0032] 観察画像記憶部21bは、観察ステージ9bにおいてカメラ10によって蛋白質溶液13を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して取り込まれた複数のレイヤー画像を記憶する(図14参照)。後述する蛋白質結晶検出処理においては、観察画像記憶部21bに記憶された各レイヤー画像が処理対象となる。
- [0033] 結晶化情報記憶部21cは、結晶化情報、すなわち蛋白質結晶検出処理において結晶化が検出されたレイヤー画像の画像データや、レイヤー画像が取得されたプレート・ウェルを特定する情報および当該プレートを観察した観察時刻などの情報を記憶する。
- [0034] ストレージ情報記憶部21dは、ストレージ部5における結晶化プレート6のストレージ情報、すなわち各収納部5aと結晶化プレート6との対応関係を示すプレート配列データを記憶する。
- [0035] レイヤー情報記憶部21eは、各レイヤー画像から、後述する一連の画像処理によって生成された画像(以下、「結晶特徴画像」と略称する。)に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を記憶する。蛋白質結晶の特徴部分とは、後述する結晶化判定において蛋白質結晶であると判定される可能性のある部分を数値化した情報(以下、「レイヤー情報」と略称する。)のことである。
- [0036] 結晶判定基準記憶部21fは、レイヤー情報記憶部21eに記憶されたレイヤー情報に基づいて蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定処理において、判定基準として用いられるしきい値データを記憶する。
- [0037] また、処理部20には、表示部23、操作・入力部24、カメラ10、照明装置11、観察

ステージ9b、搬入口開閉機構25、搬送ユニット7および温調ユニット26が接続されている。温調ユニット26は、ホストコンピュータ15から処理部20を経由して送られる温度指令に従って恒温室2の温度調整を行う。これにより、恒温室2内部の温度が設定温度に保たれる。

[0038] 搬送ユニット7は、処理部20からの制御信号に従って、恒温室2内における結晶化プレート6の搬送動作を行う。その搬送動作には、恒温室2に設けられた搬入口2aを介して搬入される結晶化プレート6をストレージ部5の所定の収納部5aに収納する動作や、収納部5aから結晶化プレート6を取り出して観察部9へセットする動作などが含まれる。

[0039] 搬入口開閉機構25は、処理部20からの制御信号に従って搬入口2aの開閉を行う。

[0040] また、処理部20が観察ステージ9b、照明装置11、カメラ10を制御することにより、観察ステージ9bに保持された結晶化プレート6の移動、照明装置11による結晶化プレート6の照明、カメラ10による蛋白質溶液の画像の取り込みが実行される。

[0041] 表示部23は、カメラ10によって取り込まれたレイヤー画像や各種の処理画像、データ入力時の案内画像などを制御パネル4の表示パネルに表示する。

[0042] 操作・入力部24は、制御パネル4などの入力装置を操作することにより、処理部20に対して操作指令やデータ入力を行う。

[0043] 次に図9の機能ブロック図を参照して、蛋白質結晶検出処理機能について説明する。図9において、微分処理部30は、観察画像記憶部21bに記憶されているレイヤー画像(図14参照)を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報から成るレイヤー微分画像を生成する(図15参照)。ここで輝度変化情報とは、レイヤー画像を構成する各画素における輝度の変化率を数値(輝度変化値)で示すものである。

[0044] レイヤー画像中では、背景領域や照明光が透過した部分など観察対象が存在しない領域では輝度変化は小さく、検出対象の蛋白質結晶の輪郭に該当する部分では輝度変化は大きい。したがって上述のレイヤー微分画像においては、画像に取り込まれた観察対象物の輪郭が輝度変化の大きい部分として抽出される。但し、このレイ

ヤー微分画像においては、検出目標である蛋白質結晶のみならず、蛋白質溶液内に存在する結晶以外の沈殿物などの固形異物や、ウェル6a内の液保持部6bの形状や液滴の輪郭なども同様に輝度変化の大きい部分として抽出される。そこで、これらの検出目標以外の輝度変化の大きい部分をノイズとして除去するノイズ除去処理(後述)が行われる。

- [0045] 微分画像記憶部31は、微分処理部30で生成されたレイヤー微分画像を記憶する。二値化処理部32は、微分画像記憶部31のレイヤー微分画像を特徴部分抽出用の閾値で二値化することにより、輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を、前述の特徴部分として残したレイヤー二値化画像を得る(図18参照)。
- [0046] そして二値化画像記憶部33は、二値化処理部32で得られたレイヤー二値化画像を記憶する。ここで、二値化処理部32による二値化処理の対象となるレイヤー微分画像に対しては、以下に説明するマスク処理、ノイズ除去処理が実行される。そして除去の対象となるノイズを認識することを目的として、ノイズ除去処理に先立ってノイズ抽出用の二値化処理および細線化処理が実行される。
- [0047] まずマスク処理について説明する。
- [0048] マスク情報記憶部36は、マスク情報、すなわち本来観察対象とする蛋白質溶液のレイヤー画像中に含まれるノイズのうち、容器である結晶化プレート6の形状に由来して現れる容器ノイズを微分画像から除去するためのマスク情報を記憶する。ここでは、マスク情報は、液保持部6bに設けられたポケットの径寸法のことである。容器ノイズとは、レイヤー画像内において蛋白質溶液を保持する結晶化容器である結晶化プレート6の形状(液保持部6bの形状)に由来してレイヤー微分画像に現れる輝度変化情報である。マスク処理部35は、マスク情報記憶部36に記憶されたマスク情報に基づき、微分画像から容器ノイズを除去するマスク処理を行う。これにより、容器ノイズが除去されたレイヤー微分画像が得られる(図16参照)。
- [0049] 次にノイズ除去処理について説明する。
- [0050] ここで行われるノイズ除去処理は、上述のマスク処理では除去できないノイズ、例えば液保持部6b頂部のポケット6d内に現れる蛋白質溶液の液滴の輪郭など、予め教示することができないノイズを対象としたものである。このため、ここでは微分画像中

の情報からどの部分がノイズであるかをノイズ認識処理部38によって認識し、このノイズ認識結果に基づきノイズ除去処理部37が微分画像中のノイズ除去を行う。これにより、ノイズが除去されたレイヤー微分画像が得られる(図16参照)。ここでは、ノイズ認識の手法として、レイヤー微分画像を細線化したレイヤー細線化画像中の線の形状的特徴に基づき、これらの線が蛋白質結晶を示す図形の輪郭などの形状を示す形状線であるか、もしくは液滴の輪郭など、明らかに蛋白質結晶を示す図形とは異なる線であるかを識別するようにしている。

- [0051] すなわちここに示すノイズ認識においては、まず二値化処理部39により、微分画像記憶部31に記憶されたレイヤー微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理する。そして細線化処理部40は、二値化処理されたレイヤー二値化画像を細線化処理する。すなわち、レイヤー二値化画像中の各線要素を1画素幅の細い線に置き換える。これにより、レイヤー微分画像中の輝度変化が大きい部分を示す範囲が細線化された複数の線から成るレイヤー細線化画像が生成され(図17参照)、生成されたレイヤー細線化画像は、細線化画像記憶部41に記憶される。
- [0052] ノイズ認識処理部38は、細線化画像記憶部41のレイヤー細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出する。
- [0053] ノイズ除去処理部37は、微分画像記憶部31に記憶されたレイヤー微分画像から、ノイズ認識処理部38でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報を除去する。
- [0054] ここで、ノイズ認識処理部38がノイズとみなす線を検出する手法として、以下に概説する複数のアルゴリズムを用いている。第1のアルゴリズムは、線の長さおよび分岐数を求め、長さが所定値を超え且つ分岐数が少ない線をノイズとみなすアルゴリズムである。第2のアルゴリズムは、線の長さおよび直線性を認識し、長さが所定値を超え且つ直線性が高い線をノイズとみなすアルゴリズムである。第3のアルゴリズムは、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが所定値を超え且つ分散度合いが小さい線をノイズとみなすアルゴリズムである。ノイズ認識処理部38は、上記3つのアルゴリズムを必要に応じて使い分け、または併用するようにしている。

- [0055] なお、マスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ除去処理においては、上記例では微分画像記憶部31に記憶された微分画像を処理対象として実行する例を示している。それに代えて、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像を対象としてマスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ除去処理を実行するように構成してもよい。
- [0056] レイヤー情報抽出部34は、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像から、前述のレイヤー情報を抽出する処理を行う。抽出されたレイヤー情報は、レイヤー情報記憶部21eに記憶される。そして結晶化判定部43は、レイヤー情報記憶部21eに記憶されたレイヤー情報に基づいて、蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判断する。
- [0057] 図9に示す鎖線枠で囲まれる各要素、すなわち微分処理部30、微分画像記憶部31、二値化処理部32、二値化画像記憶部33、マスク処理部35、マスク情報記憶部36、ノイズ除去処理部37、ノイズ認識処理部38、二値化処理部39、細線化処理部40、および細線化画像記憶部41を包括して結晶特徴画像生成部42と称する。結晶特徴画像生成部42は、観察画像記憶部21bに記憶された各レイヤー画像から、蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像、すなわちレイヤー二値化画像を、レイヤー画像毎に生成する。
- [0058] 本実施の形態において、微分処理部30、二値化処理部32、マスク処理部35、ノイズ除去処理部37、ノイズ認識処理部38、二値化処理部39、および細線化処理部40は、結晶検出プログラム22aを実行する処理部20によって実現される機能である。また、微分画像記憶部31、二値化画像記憶部33、および細線化画像記憶部41は処理画像記憶部21aに含まれる。なお、処理部20、通信インターフェイス17、データ記憶部21、およびプログラム記憶部22が、図3に示すようにコンピュータ50に搭載されていてもよい。コンピュータ50の搭載位置および搭載台数は図3の例に限定されない。例えば、インターネットを経由して外部のサーバーや外部コンピュータを利用することも出来る。
- [0059] この蛋白質結晶検出装置1は上記のように構成されており、次に蛋白質結晶を検出するための観察動作について、図10のフローを参照して説明する。この観察動作

は、処理部20が観察動作プログラム22bを実行することにより行われ、観察動作開始に際しては、上流側装置から搬入口2aを介して搬入された結晶化プレート6は、収納部5aに収容・保管されている。

[0060] まず図10において、指定された結晶化プレート6を搬送ユニット7によってストレージ部5から取り出して観察ステージ9bへ移動する(ST1)。そして先頭のウェル6aをカメラ10の直下の観察位置に位置決めする(ST2)。この後、照明装置11を点灯して、カメラ10によって画像取り込みを実行する(ST3)。すなわち、観察ステージ9bにおいて結晶化プレート6に保持された蛋白質溶液13を合焦方向が異なる複数の断面毎に撮像して、複数のレイヤー画像を取り込む(画像取込工程)。取り込まれた複数のレイヤー画像は、観察画像記憶部21bに記憶される(画像記憶工程)。

[0061] この後、観察画像記憶部21bに記憶されたレイヤー画像に基づき、後述する蛋白質結晶検出処理が実行される(ST4)。そして当該ウェルを対象とした蛋白質結晶検出処理が終了したならば、次のウェルの有無を判断する(ST5)。ここで次のウェルがある場合には、次のウェルを観察位置に位置決めし(ST6)、ステップST3に戻って同様の処理を反復実行する。そしてステップST5にて「次のウェル無し」、と判断されたならば、処理が完了した結晶化プレート6を収納部5aに返却する(ST7)。そしてホストコンピュータ15に観察動作終了を通知して(ST8)、観察動作実行処理を終了する。

[0062] 上述の観察動作において、結晶化プレート6を恒温室2から外部に持ち出すことなく全ての動作を行うことが可能となっている。これにより、観察の都度結晶化プレートを持ち出す方式と比較して、結晶化プレートの温度条件が変化することによる結晶育成条件のばらつきを排除してスクリーニング精度を向上させることができる。さらに、結晶化プレートを冷却状態から室温に曝す際に生じる結露による観察視野の曇りが発生せず、良好な観察結果を得ることが可能であり、蛋白質結晶検出のための観察作業を効率よく高い信頼性で行うことができる。

[0063] 次に、ステップST3において取り込まれたレイヤー画像、およびステップST4にて実行される蛋白質結晶検出処理について説明する。

[0064] まず観察対象の蛋白質溶液13の経時変化について、図13を参照して説明する。

前述のように結晶化生成の開始に際しては、ウェル6aの液保持部6bには、所定割合の結晶化溶液12が加えられた蛋白質溶液13の液滴が載置される(図5参照)。図13Aは、結晶化生成の初期における液保持部6bの断面を示しており、この段階では蛋白質溶液13の液滴は液保持部6bのポケット6dをほぼ満たした状態にあり、液滴内部には未だ蛋白質結晶が見られない。

[0065] ここで結晶生育条件、すなわち結晶化溶液12の組成・濃度や保管温度が望ましい条件に適っている場合には、蛋白質溶液13内では時間の経過とともに結晶化が進行する。図13Bは、結晶化がある程度進行した状態における液保持部6bの断面を示している。この状態では、蛋白質溶液13中の溶媒成分が徐々に蒸発することにより、ポケット6d内で液滴が縮小するにつれて液滴の輪郭(矢印Bで示す)が、図13Aの状態よりもポケット6d内部側に移動している。そして液滴の縮小によって露呈したポケット6d底面には、液滴内に含まれていた蛋白質が結晶化した蛋白質結晶13aが残留している。さらに液滴内部においても結晶化が進行し、蛋白質結晶13aが生成されている。

[0066] 図14は、図13Bに示す状態におけるレイヤー画像を示しており、ポケット6d内で溶媒の蒸発がある程度進行し体積が縮小した状態の液滴を上方から取り込んだ画像が含まれている。このレイヤー画像中では、図14に示すように、低輝度の背景画像(密ハッチング部で示す)中に、液保持部6bの頂部を示す環状部分A(疎ハッチング部で示す)が比較的高い輝度で現れている。

[0067] そしてこの環状部分Aの内側のポケット6d内で、蛋白質溶液13の液滴は部分的に輝度が異なる画像として現れている。ここで、環状部分Aの内側で液滴が存在しない部分は下方からの照明光(図13B参照)が透過することによって高輝度部分となっており、蛋白質溶液13の液滴の輪郭Bはこの高輝度部分とのコントラストによってレイヤー画像中で明瞭に現れている。また環状部分Aの内周に沿って、部分的に線状の高輝度部分Cが現れている。

[0068] そして検出対象の蛋白質結晶13aは、環状部分Aの内側の領域に存在している。すなわち、蛋白質溶液13の液滴内部に存在する蛋白質結晶13aのうち、カメラ10による合焦レベルf(図13B参照)の近傍に存在する蛋白質結晶13aは、図14のレイヤ

一画像中で合焦点が高く明瞭に現れ、合焦レベルfから外れた位置にある蛋白質結晶13aは合焦点が低くぼやけた輪郭で現れる。またポケット6dの表面に残置された形で存在する液滴外の蛋白質結晶13aも同様に、合焦点が低くぼやけた輪郭で現れる。さらにこれ以外にも、レイヤー画像中には結晶化に至らなかった沈殿物などの固形異物が存在する。なお、ぼやけた輪郭で現れる蛋白質結晶13aを破線で示す。

[0069] 蛋白質結晶の検出において、レイヤー画像中に現れるこれらの図形を目視観察によって正確に識別することは困難であり、検出対象の蛋白質結晶を高い信頼度で効率よく検出することができない。そこで、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出方法では、プログラム記憶部22に記憶された結晶検出プログラム22aを処理部20が実行することにより、複数のレイヤー画像(図6Bに示す複数のレイヤーL1～L5参照)に対して図11のフローに示す蛋白質結晶検出処理を行い、蛋白質結晶の識別を自動的に行わせるようにしている。

[0070] 図11に示すように、処理開始に際しては、レイヤー番号を特定するためのカウンタ値Kを初期値0にセットし(ST11)、次いでカウンタ値Kに1を加算し(ST12)、その後、以下の処理が実行される。

[0071] まずレイヤー画像に対して微分処理を行う(ST13)。すなわち、予め観察画像記憶部21bに記憶された蛋白質溶液のレイヤー画像を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなるレイヤー微分画像を生成する。これにより、図15に示すように、図14のレイヤー画像中に現れている蛋白質結晶13aの外形を示す形状線や、液滴の輪郭B、環状部分Aの内周の高輝度部分Cなど、輝度変化が大きい部分が高輝度で現れる。なお、レイヤー微分画像は本来各画素が輝度変化値に応じた明るさで現れる多値画像であるが、図15では図示の便宜のため白黒二値画像で表している。

[0072] 次いで、このレイヤー微分画像に対してマスク処理を行う(ST14)。ここでは、蛋白質溶液13を保持している結晶化プレート6の液保持部6bに由来する輝度変化情報を、容器ノイズとしてレイヤー微分画像から除去する。容器ノイズ除去は、結晶化プレート6の液保持部6bの形状として予め教示されているマスク情報に基づいて、蛋白質溶液13が保持されている可能性のない所定領域の輝度変化情報を除去すること

により行われる。

[0073] ここでは、図15に示すレイヤー微分画像中の輝度変化情報のうち、蛋白質溶液13が保持されている範囲以外に存在する輝度変化が大きい部分、すなわち図14に示す環状部分Aの内周部を含んでこれらよりも外側の領域に現れる輝度変化が大きい部分をノイズとして除去する。これにより、図16に示すように、蛋白質結晶が存在する可能性がある領域のみを含んだレイヤー微分画像(マスク処理)が得られる。

[0074] このようにしてマスク処理が行われたレイヤー微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理し、さらに細線化処理を行う(ST15)。図17は、この細線化処理によって得られたレイヤー細線化画像を示しており、レイヤー微分画像中の高輝度部分、すなわちタンパク質結晶13aの形状線や液滴の輪郭などは、いずれも幅が1画素の線に置き換えられている。

[0075] このようにして作成されたレイヤー細線化画像に含まれるノイズを認識する(ST16)。すなわちレイヤー細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出する。そしてレイヤー微分画像に対してノイズ除去処理を行う(ST17)。すなわち、ステップST16においてノイズとみなされて検出された線を、二値化処理されたレイヤー微分画像から除去する。図18は、このノイズ除去処理によって得られたレイヤー部分画像(ノイズ除去)を示している。

[0076] この後、蛋白質結晶に該当する可能性が高い特徴部分の抽出を行う。まず、レイヤー微分画像(ノイズ除去)を特徴部分抽出用の閾値で二値化処理する(ST18)。これにより、大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残したレイヤー二値化画像を得る。ここで用いられる閾値は、前述のノイズ抽出用の閾値よりも高い値に設定される。

[0077] この二値化処理工程においては、特徴部分についてラベリングを行い、面積が所定値よりも大きいラベルのみを残してその他を消去する処理を併せて行う。これにより、蛋白質結晶である可能性が小さい小さな特徴部分がノイズとみなされて除去される。図19はこのようにして得られたレイヤー二値化画像を示す。図19の画像中には蛋白質結晶である可能性が高い特徴部分のみが現れている。すなわち、レイヤー二値化画像は、各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像と

なっている。ステップST13～ステップST18にて実行される処理は、各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像を、レイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程となっている。得られたレイヤー二値化画像は、二値化画像記憶部33に記憶される。

[0078] 次いで、得られたレイヤー二値化画像の画素数とラベル数をカウントする(ST19)。ここでは各レイヤー二値化画像において、特徴部分に該当する高輝度部分の画素の総数を示す画素数と、これらの高輝度の画素のかたまりであるラベルの総数を示すラベル数を求める。これにより、結晶特徴画像に含まれる特徴部分を数値化したレイヤー情報が、レイヤー画像毎に求められる(レイヤー情報抽出工程)。すなわち本実施の形態においては、レイヤー情報は少なくとも蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数と、これらの画素のかたまりであるラベルの数とを含んでいる。

[0079] 表1は、図11の処理によって求められたレイヤー情報の例を示している。ここでは、全レイヤー数 n が5の場合の例を示しており、レイヤー番号L1～L5毎に、画素数およびラベル数が求められている。

[0080] [表1]

レイヤー番号	画素数	ラベル数
L1	1013	36
L2	2381	71
L3	5902	184
L4	8055	268
L5	4442	174

[0081] なお、前述の容器ノイズ除去のためのマスク処理、ノイズ除去処理を、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像を対象として行うようにしてもよい。この

場合には、レイヤー二値化画像中に残された特徴部分のうち、ノイズとみなされた検出された線に該当するものをレイヤー二値化画像から除去する。

[0082] 次いでカウンタ値Kを参照し、この値が全レイヤー数n(図6Bに示す例ではn=5)に到達していなければ、ステップST12に戻って次のレイヤー画像を対象として、ステップST13～ステップST19の処理を実行する。そしてステップST20にて、カウント値Kが全レイヤー数nに到達したことが確認されて、全てのレイヤー画像についてレイヤー情報を求める処理が完了したならば、結晶化判定を実行し(ST21)、当該ウェルにおける蛋白質結晶の生成状況を判定する(結晶化判定工程)。そして結晶化情報記憶部21cに、上記判定結果を結晶化プレート情報として、ウェル情報、観察画像、観察時刻とともに記憶する(ST22)。これにより、1つのウェル6aを対象とした蛋白質結晶検出処理が終了し、同様の処理が他のウェルを対象として反復実行される。

[0083] 次に、上述の処理のステップST21にて蛋白質結晶の生成状況を判断するために実行される結晶化判定の詳細について、図12のフローに沿って説明する。

[0084] 最初に、ここで使用される語句および記号の定義を説明する。表1において、最大の画素数を有するレイヤー二値化画像に対応するレイヤーを、蛋白質結晶が存在する可能性が最も高い代表レイヤーと定義する。表1に示す例では、レイヤーL4が代表レイヤーである。代表画素数は、この代表レイヤーに対応するレイヤー二値化画像における特徴部分の画素数を意味している。そして代表レイヤーに隣接する上下2つのレイヤーのうち、より大きい画素数に対応したレイヤーを、複数のレイヤー間相互の相対関係を数値データ化する対象となる対象隣接レイヤーと定義しており、この対象隣接レイヤーに対応する画素数が隣接レイヤー画素数となる。なお、表1に示す例では、代表レイヤーL4に対して上側に隣接するレイヤーL3が対象隣接レイヤーである。

[0085] 代表ラベル数は、代表レイヤーのレイヤー二値化画像における特徴部分の画素のかたまり(ラベル)の数を意味している。また最大ラベル画素数は、全レイヤーを通して最大サイズのラベルの画素数を示す。代表画素数、最大ラベル画素数は、いずれもその値が大きいほど蛋白質結晶化が進行している可能性が高いことを意味している。

[0086] そして、式(1)に示すように、代表平均画素数は、代表画素数を代表ラベル数で除した数値であり、1つのラベルあたりの平均的な画素数を示している。代表平均画素数が大きいほど、特徴部分が大きなサイズで検出されたことを意味しており、したがって蛋白質結晶の存在可能性が高いこととなる。

[0087] また、式(2)に示すレイヤー間非変動率は、上述の隣接レイヤー画素数を代表画素数で除した比率を%で表示した数値であり、隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係から求められるものである。レイヤー間非変動率が大きいほど、ある厚みを介して隣接した2つのレイヤーにわたって、同一の物質が存在している蓋然性が高く、したがって蛋白質結晶の存在可能性が高いことを意味する。

[0088] [数1]

$$\text{代表平均画素数} = \frac{\text{代表画素数}}{\text{代表ラベル数}} \quad \dots\dots (1)$$

[0089] [数2]

$$\text{レイヤー間非変動率} = \frac{\text{隣接レイヤー画素数}}{\text{代表画素数}} \times 100 \quad \dots\dots (2)$$

[0090] このレイヤー間非変動率を求めることにより、隣接する二つのレイヤー間に同一の物質が共通して存在する割合を推定することができる。このレイヤー間非変動率を結晶化判定の判定パラメータとして用いることにより、ある厚みを持った蛋白質結晶の存在と厚みが小さい沈殿物などの非結晶生成物の存在とを、数値データに基づいて識別することが可能となっている。

[0091] 次に、図12の結晶化判定処理において用いられる判定パラメータおよび判定しきい値として用いられる結晶判定基準データについて説明する。上述の説明において定義した判定パラメータのうち、代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数およびレイヤー間非変動率の4つの判定パラメータが、以下に示す判定処理において用いられている。図9に示す結晶化判定部43は、これらの判定パラメータに基づい

て、蛋白質溶液の結晶の生成状態を判定する。これらのうち、代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数は、各レイヤー画像単独のレイヤー情報から求められ、レイヤー間非変動率は隣接する2断面のレイヤー画像におけるレイヤー情報の相対関係から求められる。

[0092] これらの判定パラメータに対して、以下のような判定しきい値が設定されている。図12において用いられているPN1～PN5は、画素数によって規定される判定しきい値である。ここで、PN1, PN2, PN4は代表画素数を判定パラメータとして用いる場合の判定しきい値であり、PN3, PN5は、それぞれ代表平均画素数、最大ラベル画素数を判定パラメータとする場合の判定しきい値である。またR1, R2は、前述のレイヤー間非変動率を判定パラメータとする場合の判定しきい値である。本実施の形態に示す例では、これらの判定しきい値の初期値として、以下の数値を採用している。

[0093] PN1:5000画素、PN2:500画素、PN3:40画素
PN4:500画素、PN5:200画素、R1:30%、R2:40%

以下、判定処理フローの詳細を説明する。

[0094] まず、図11に示す処理にて求められた各レイヤー画像のレイヤー情報から、上述の代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数およびレイヤー間非変動率の4つの判定パラメータの値を演算しておく。そして図12において、代表画素数がPN1以上であり且つレイヤー間非変動率がR1以上であるという条件に該当するか否かを判断する(ST31)。ここで、この条件に該当しているならば、蛋白質結晶に該当する特徴部分が平面的に見て所定範囲以上で検出され、且つ立体的に見て所定割合以上の部分が結晶と判断して差し支えないほどの厚みを有していると推定される。したがってこの場合には、当該ウェルには結晶ありと判定され(ST33)、これにより結晶化判定処理を終了する。

[0095] 図20A、20Bは、この判定アルゴリズムによって結晶ありと判定されたウェルの二値化レイヤー画像の例を示している。図20Aに示す代表レイヤーのレイヤー二値化画像においては、PN1を超える画素数がカウントされており、代表画素数がPN1以上という条件を満たしている。そして図20Bに示す対象隣接レイヤーのレイヤー二値化画像においても、相当数の画素数がカウントされている。したがってレイヤー間非変動

率は高く(この例では約74%)、R1を大幅に上回っている。

- [0096] ステップST31において、上述の条件に該当しない場合には、ステップST32に進む。ステップST32では、代表画素数がPN4以上であり且つ最大ラベル画素数がPN5以上であるという条件に該当するか否かを判断する。ここで、この条件に該当しているならば、蛋白質結晶に該当する特徴部分が平面的に見て所定範囲以上で検出され、且つ個々のラベルで見た場合に所定サイズ以上のものが検出されていることを意味している。そしてこの場合にも同様に、当該ウェルには結晶ありと判定され(ST33)、これにより結晶化判定処理を終了する。
- [0097] ステップST32において、上述の条件に該当しない場合には、ステップST34に進む。ステップST34では、代表画素数がPN2以上、且つPN1未満という条件が満たされており、かつ、レイヤー間非変動率がR2以上であるか、もしくは代表平均画素数がPN3以上であるという何れかの条件が満たされている場合には、ステップST34の条件に該当すると判断される。そしてこの場合には、当該ウェルには蛋白質結晶には至らないものの、結晶化の可能性を有する生成物ありと判定され(ST35)、これにより結晶化判定処理を終了する。
- [0098] ステップST34において、所定の条件に該当しない場合には、ステップST36に進む。ステップST36では、代表画素数がPN2以上且つPN1未満という条件と、レイヤー間非変動率がR2未満であるという条件と、代表平均画素数がPN3未満であるという3つの条件とがともに満たされている場合には、ステップST36の条件に該当すると判断される。そしてこの場合には、当該ウェルには蛋白質結晶に該当しない沈殿物、すなわち非結晶生成物ありと判定され(ST38)、これにより結晶化判定処理を終了する。
- [0099] ステップST36において、所定の条件に該当しない場合には、ステップST37に進む。ここでは、代表画素数がPN1以上という条件と、レイヤー間非変動率がR1未満であるという条件とがともに満たされている場合には、ステップST37の条件に該当すると判断される。そしてこの場合にも同様に、当該ウェルには蛋白質結晶に該当しない沈殿物、すなわち非結晶生成物ありと判定され(ST38)、これにより結晶化判定処理を終了する。

- [0100] 図21A, 21Bは、この判定アルゴリズムによって非結晶生成物ありと判定されたウェルの二値化レイヤー画像の例を示している。図21Aに示す代表レイヤーのレイヤー二値化画像においては、PN1を超える画素数がカウントされており、代表画素数はPN1以上となっている。これに対し、図20Bに示す対象隣接レイヤーのレイヤー二値化画像においては少ない画素数しかカウントされておらず、したがってレイヤー間非変動率は低く(この例では約19%)、R1(30%)を下回っている。
- [0101] またステップST37において、所定の条件に該当しない場合には、蛋白質結晶、生成物、非結晶生成物のいずれも存在しないと判定され(ST39)、これにより結晶化判定処理を終了する。
- [0102] 図12に示す一連の判定を行うことにより、「結晶あり」、「生成物あり」、「非結晶生成物あり」、「無し」のいずれかの判定が、結晶化プレート情報として記憶される。
- [0103] 上記説明したように、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出における結晶化判定では、各レイヤー画像単独のレイヤー情報から求められる判定パラメータ(1)、及び隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係から求められる判定パラメータ(2)に基づいて、ウェル6aの蛋白質溶液13の結晶の生成状況が判定される。なお、判定パラメータ(1)は代表画素数、最大ラベル画素数および代表平均画素数を含み、判定パラメータ(2)はレイヤー間非変動率を含む。また、判定される結晶の生成状況には、蛋白質結晶と、蛋白質結晶以外の生成物の有無が含まれる。
- [0104] これにより、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の沈殿物などの生成物を、厚みの違いによって識別することが可能となり、従来技術による蛋白質結晶の検出における課題、すなわち沈殿物などの生成物と検出対象の蛋白質とを画像上で明確に識別することが困難であるという課題を解決して、蛋白質結晶を高い精度で検出できる。
- [0105] なお上記実施の形態では、レイヤー二値化画像の特徴部分にノイズを含まないようにマスク処理部35やノイズ除去処理部37で処理を行っているが、容器の形状や照明の条件等によりノイズを殆ど含まないレイヤー画像が得られる場合には、マスク処理部35やノイズ除去処理部37での処理を省略することができる。また上記実施の形態では、結晶特徴画像生成部42として微分処理により蛋白質結晶の特徴部分を抽出するようにしているが、これ以外の方法、例えば、蛋白質結晶の色に着目して特徴

部分を抽出するようにしてもよい。

産業上の利用可能性

[0106] 本発明の蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法は、蛋白質結晶と沈殿物などの非結晶生成物とを精度良く識別して蛋白質結晶を高い精度で検出することができるという効果を有し、生化学分野などにおいて蛋白質の構造解析に先立って行われる蛋白質結晶化处理において有用である。

請求の範囲

- [1] 結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置であって、
観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージと、
前記観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込むカメラと、
前記カメラによって取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する観察画像記憶部と、
前記観察画像記憶部に記憶された各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成部と、
前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報をレイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出部と、
各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定部と
を備えたことを特徴とする蛋白質結晶検出装置。
- [2] 前記結晶特徴画像は蛋白質結晶の特徴部分を抽出した二値化画像であり、
前記レイヤー情報は、少なくとも前記二値化画像において蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数とこれらの画素のかたまりであるラベルの数とを含むことを特徴とする請求項1記載の蛋白質結晶検出装置。
- [3] 前記結晶化判定部は、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の生成物の有無を判定することを特徴とする請求項1または2記載の蛋白質結晶検出装置。
- [4] 結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法であって、
観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込む画像取込工程と、
取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する画像記憶工程と、

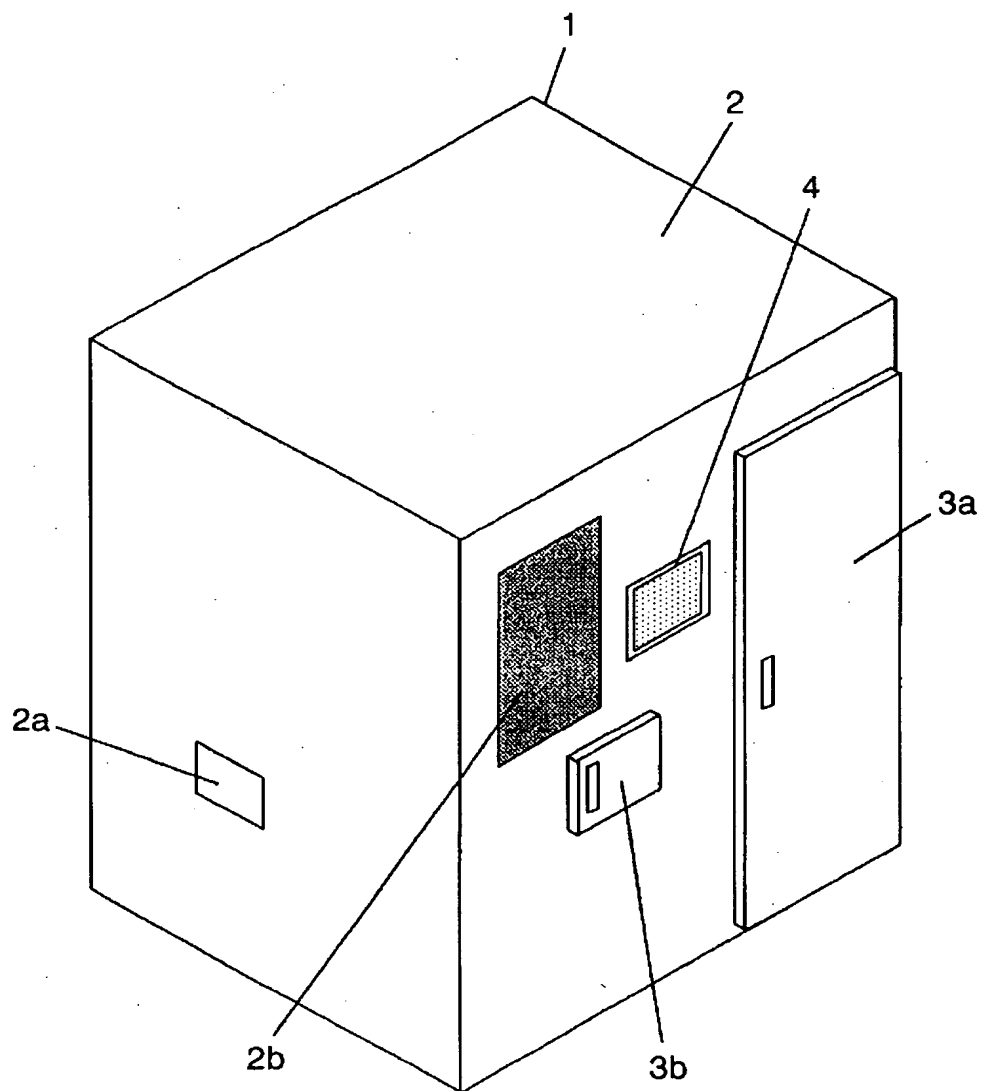
前記各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程と、

前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報をレイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出工程と、

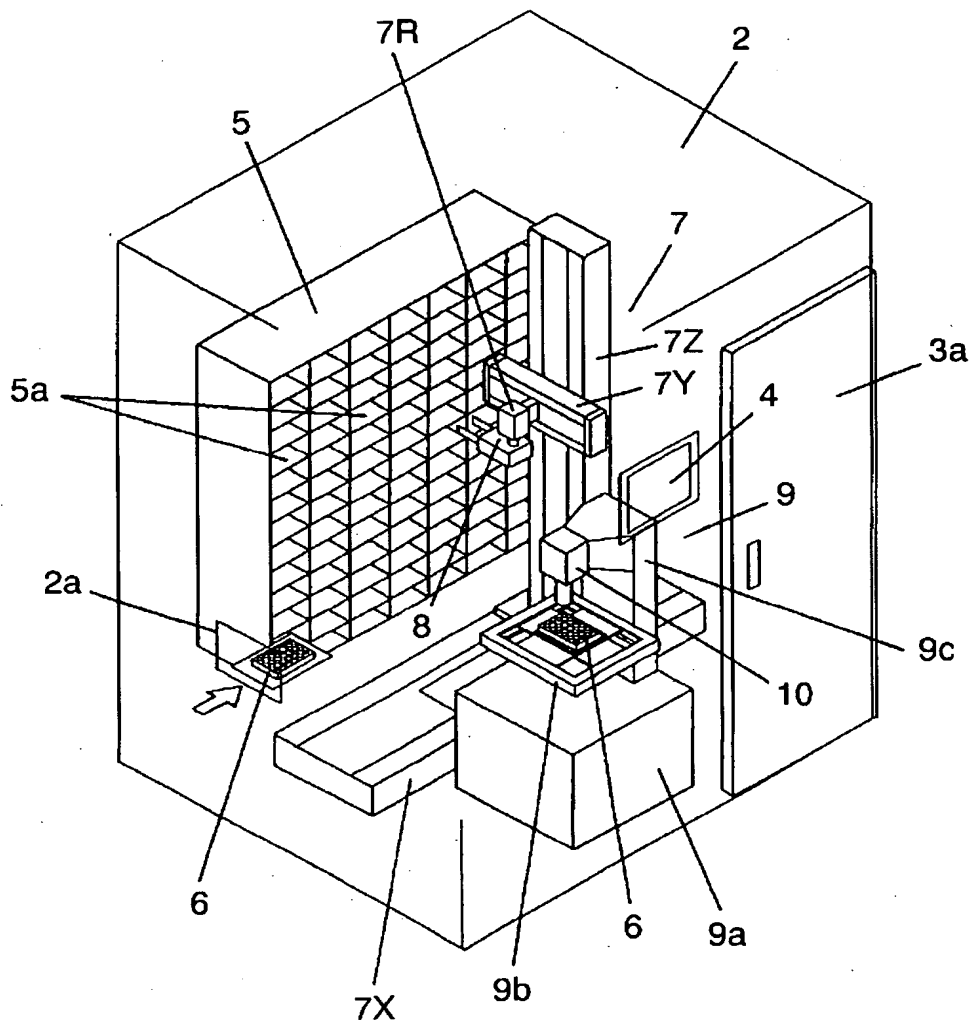
各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定工程と、を含むことを特徴とする蛋白質結晶検出方法。

- [5] 前記結晶特徴画像生成工程において、蛋白質結晶の特徴部分を抽出した二値化画像が生成され、前記レイヤー情報が、少なくとも前記二値化画像において蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数とこれらの画素のかたまりであるラベルの数とを含む、ことを特徴とする請求項4記載の蛋白質結晶検出方法。
- [6] 前記結晶化判定工程において、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の生成物の有無が判定される、ことを特徴とする請求項4または5記載の蛋白質結晶検出方法。

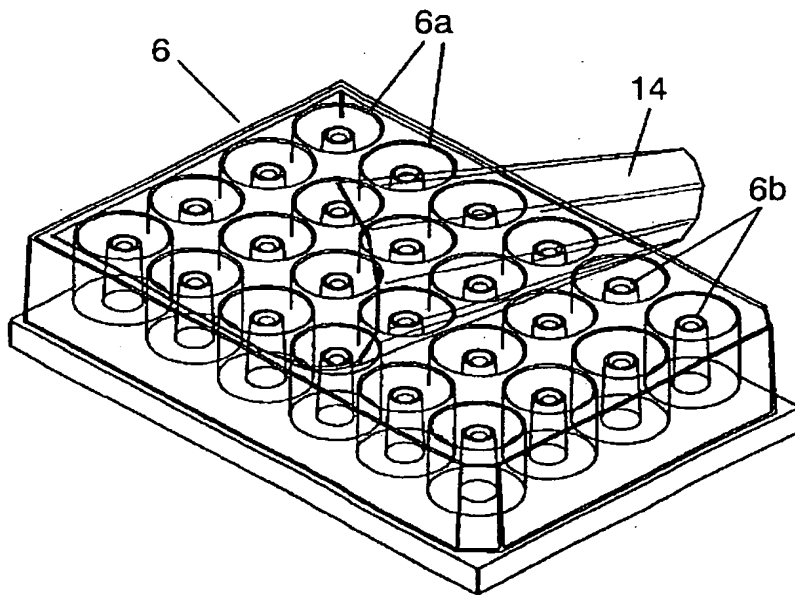
[[図1]]



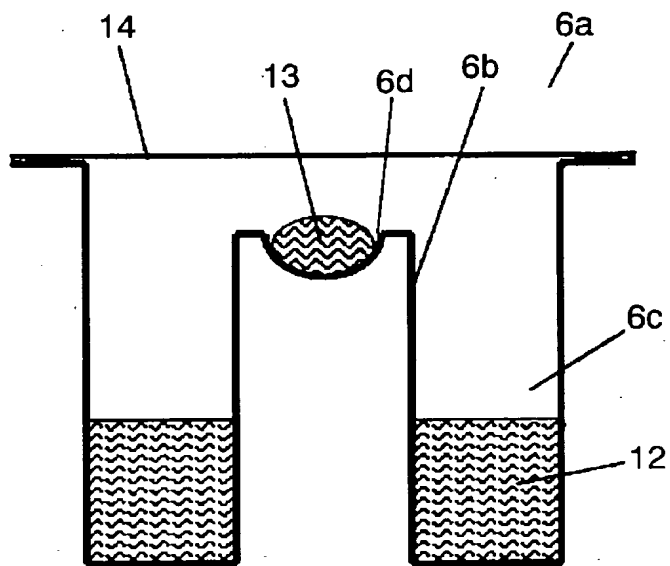
[図2]



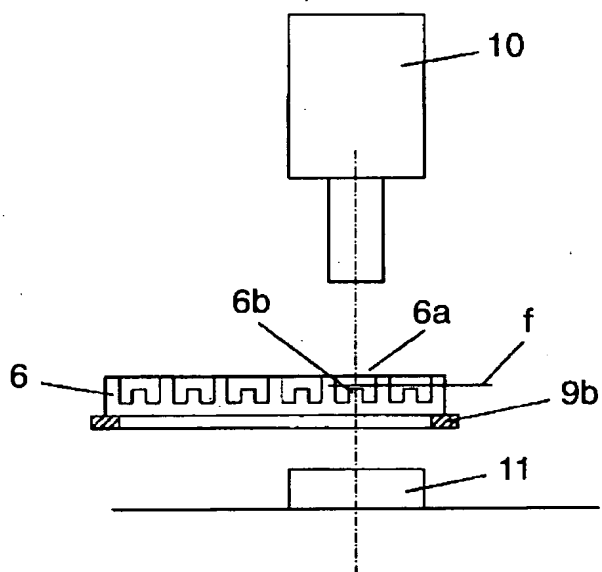
[図4]



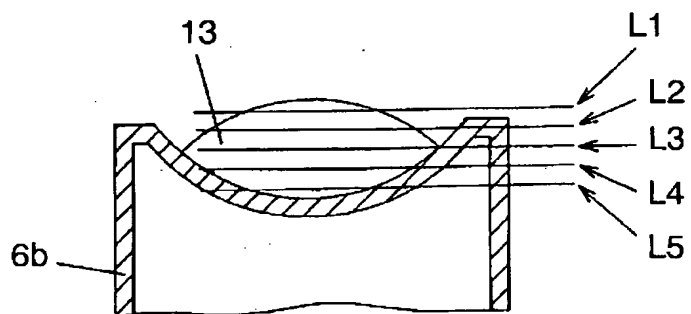
[図5]



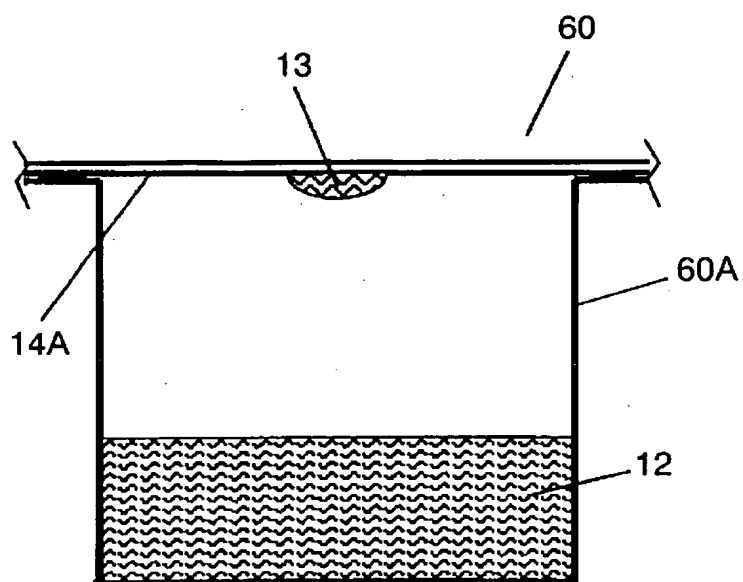
[図6A]



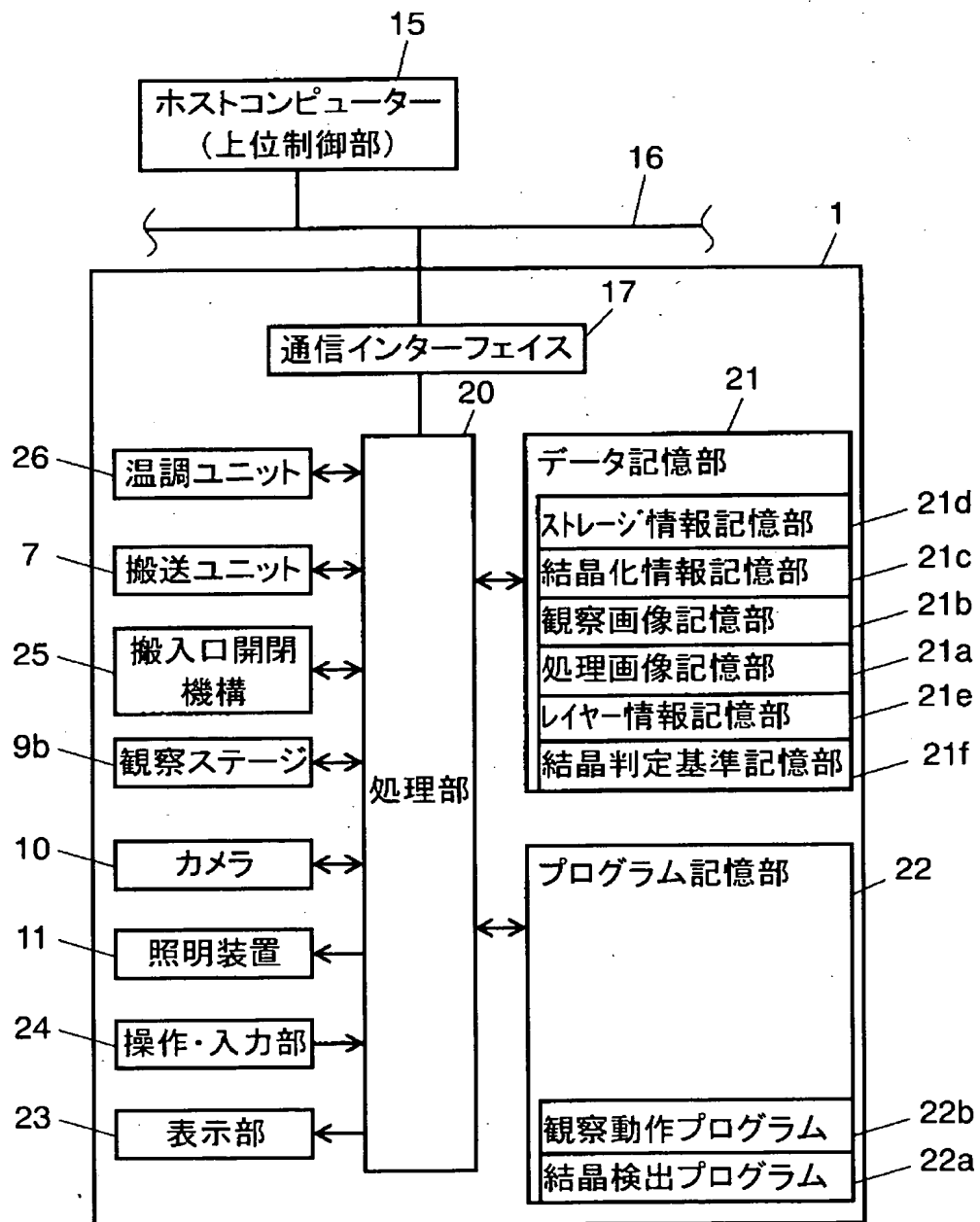
[図6B]



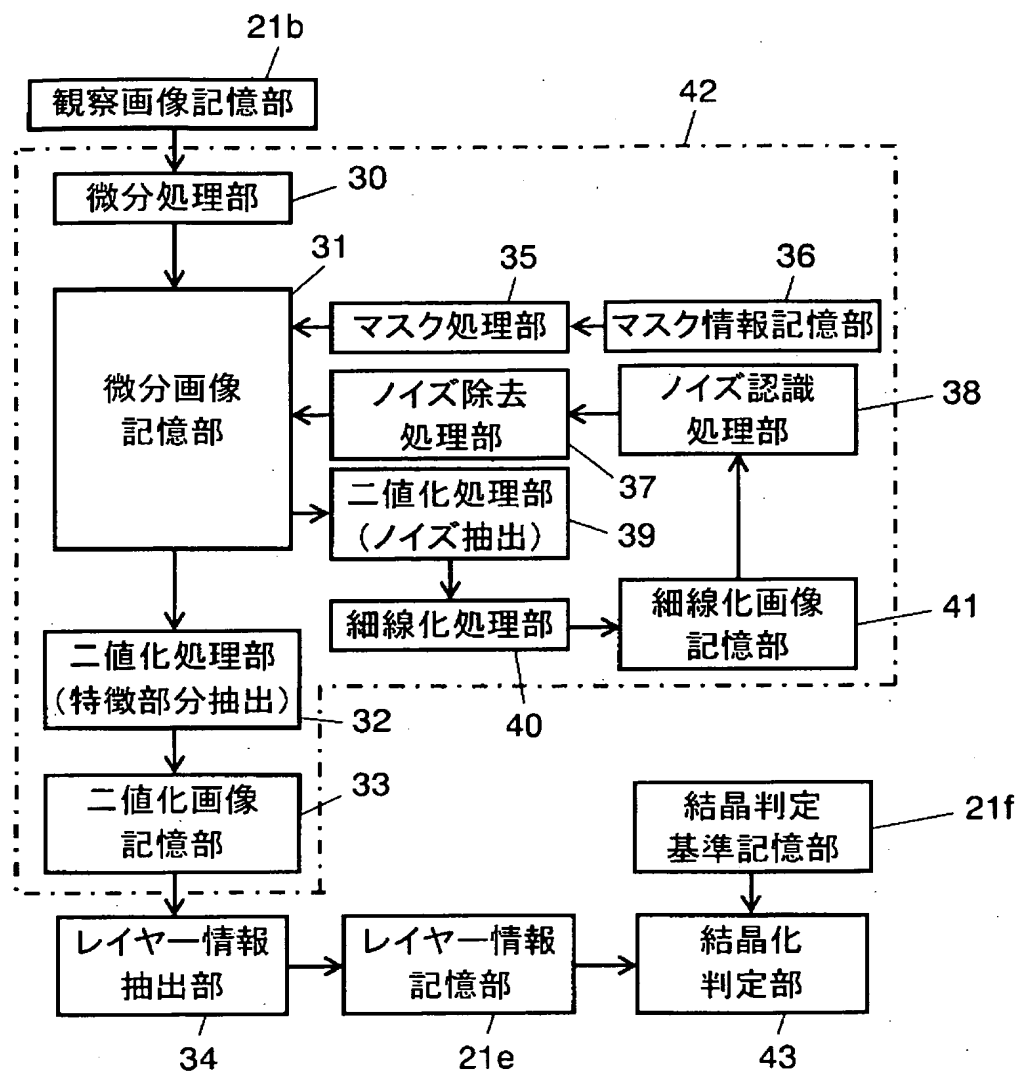
[図7]



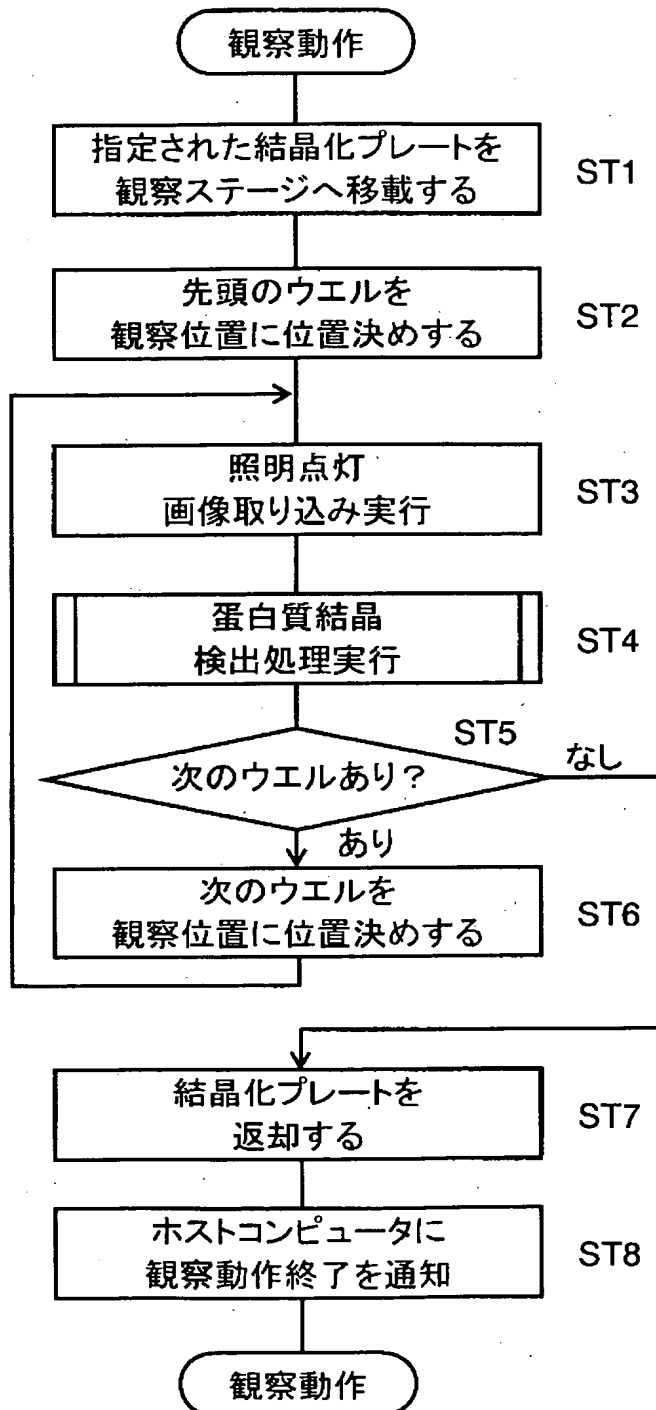
[図8]



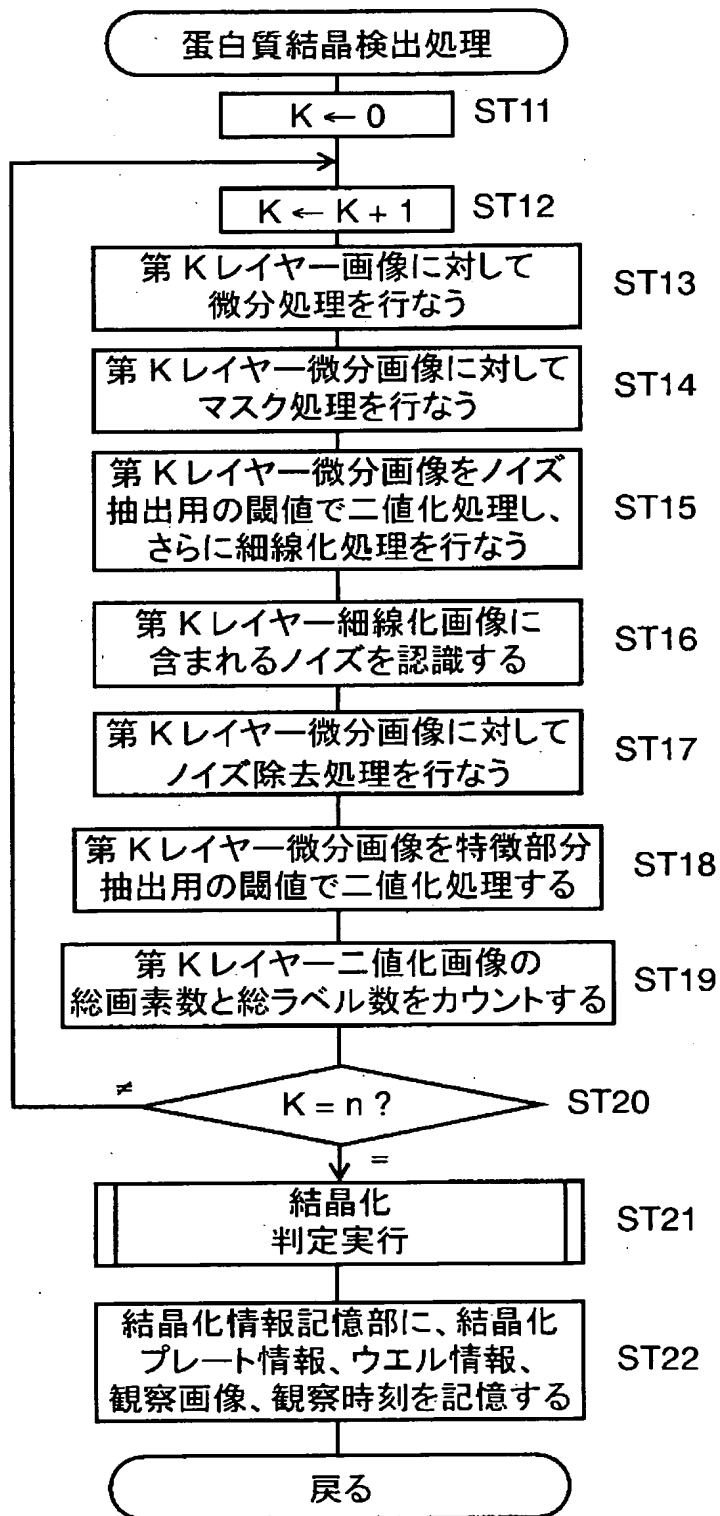
[図9]



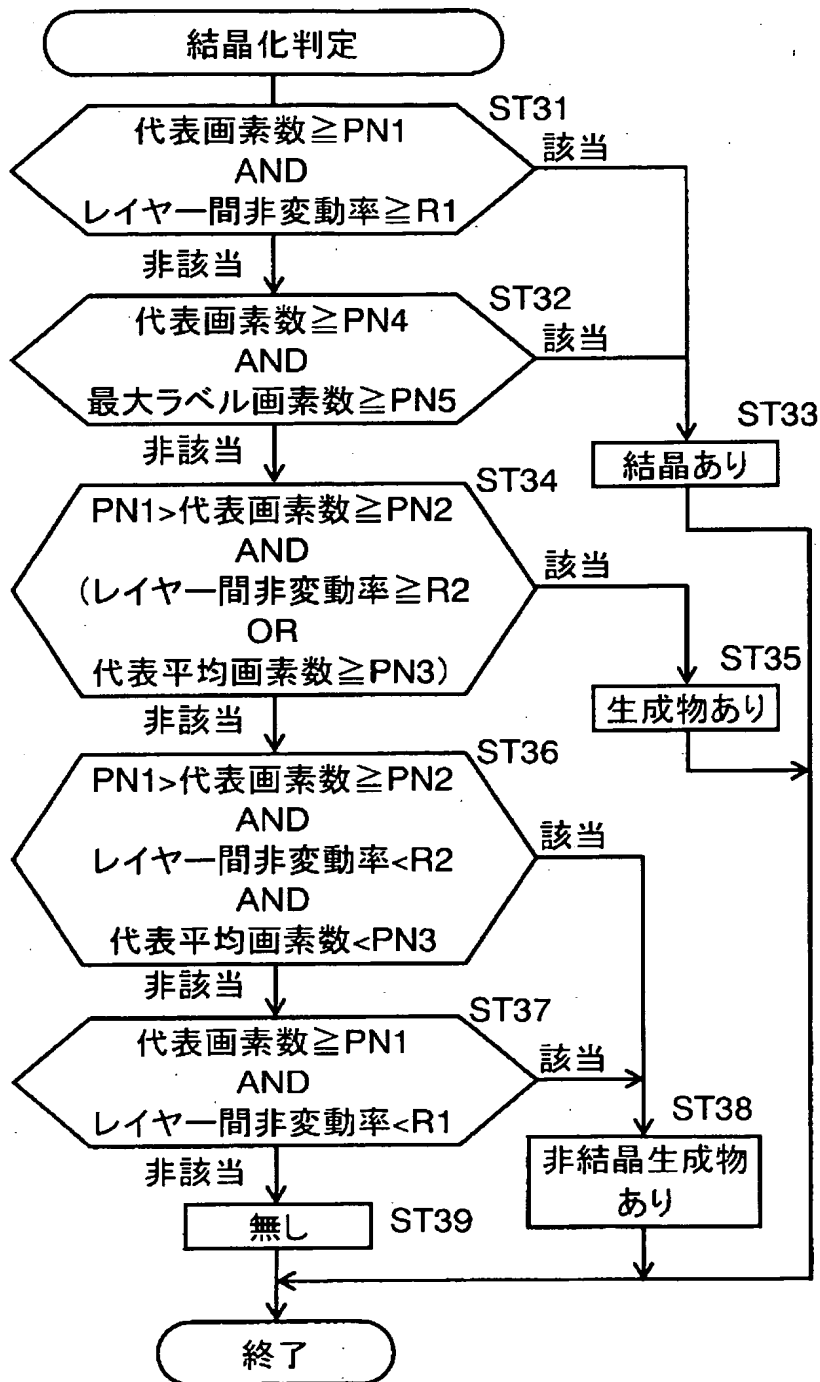
[図10]



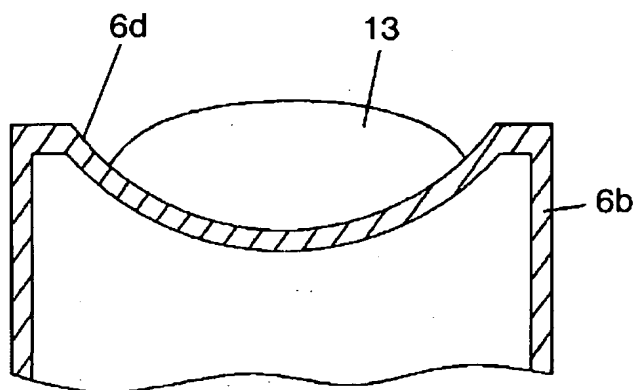
[図11]



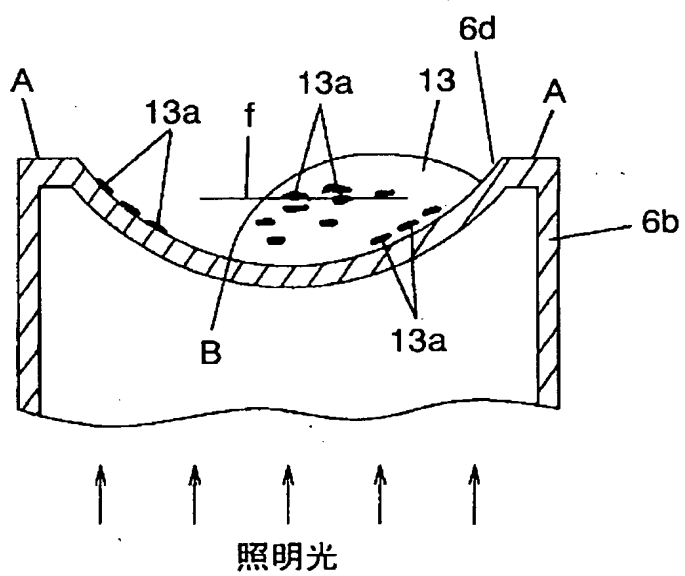
[図12]



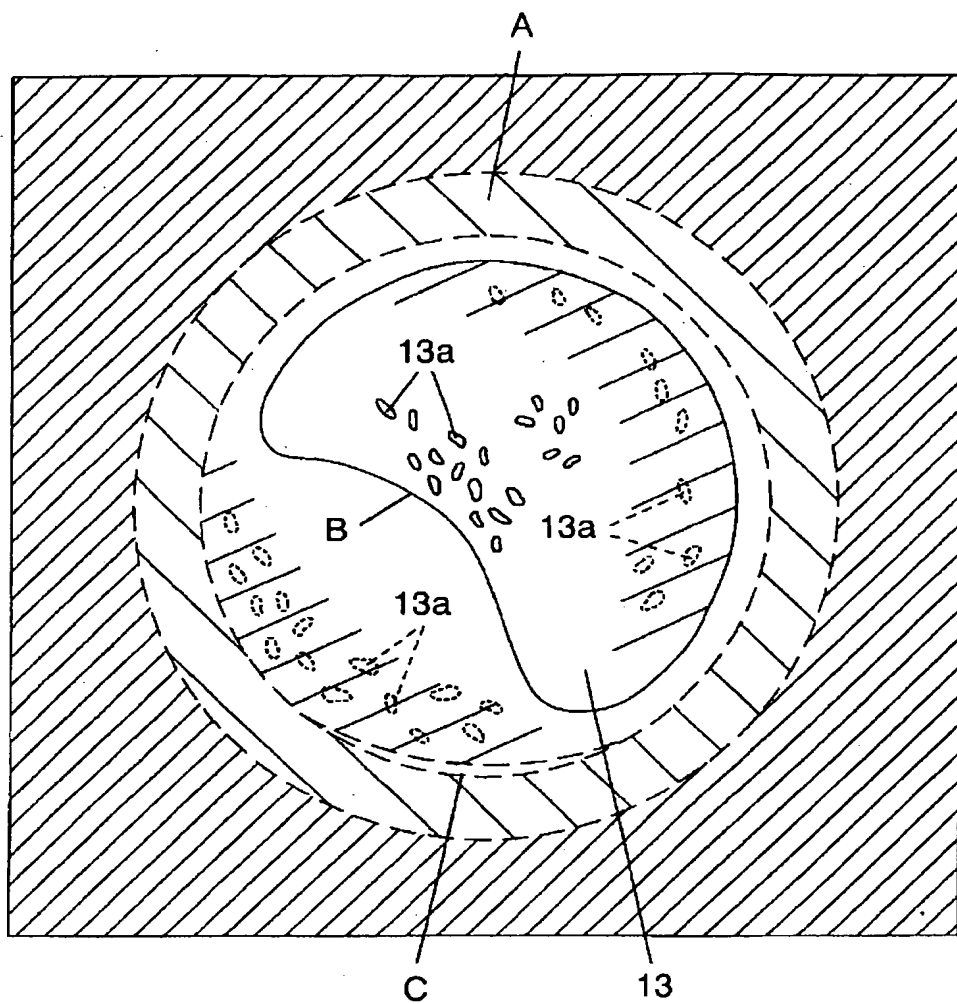
[[図13A]]



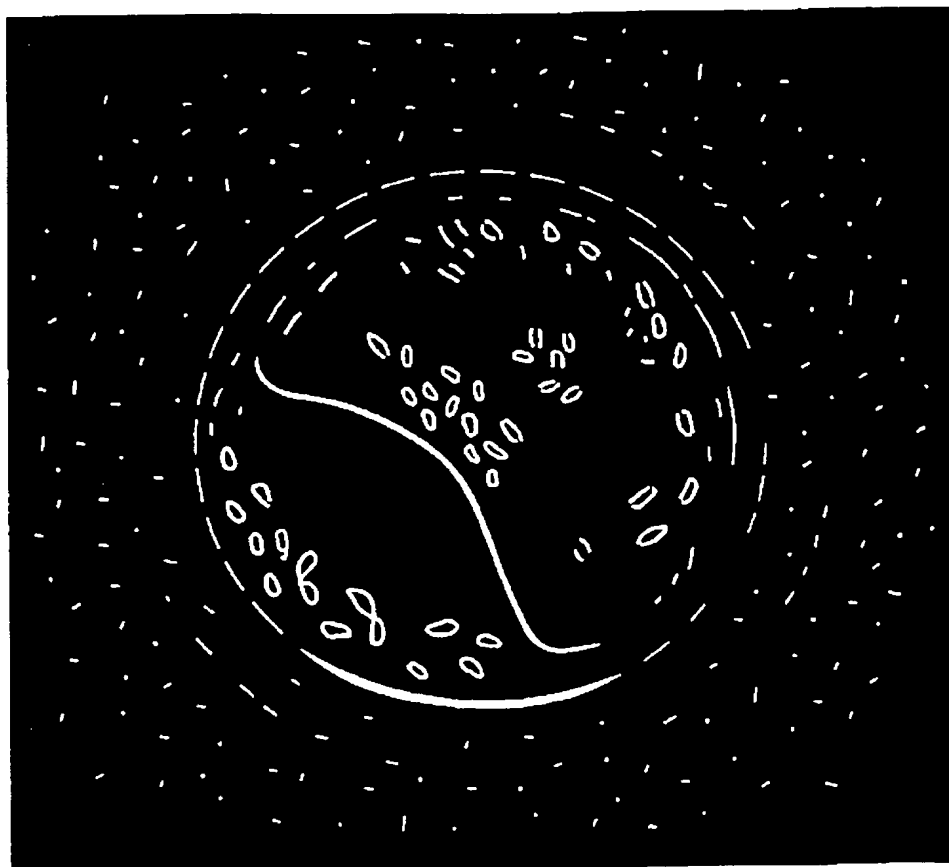
[[図13B]]



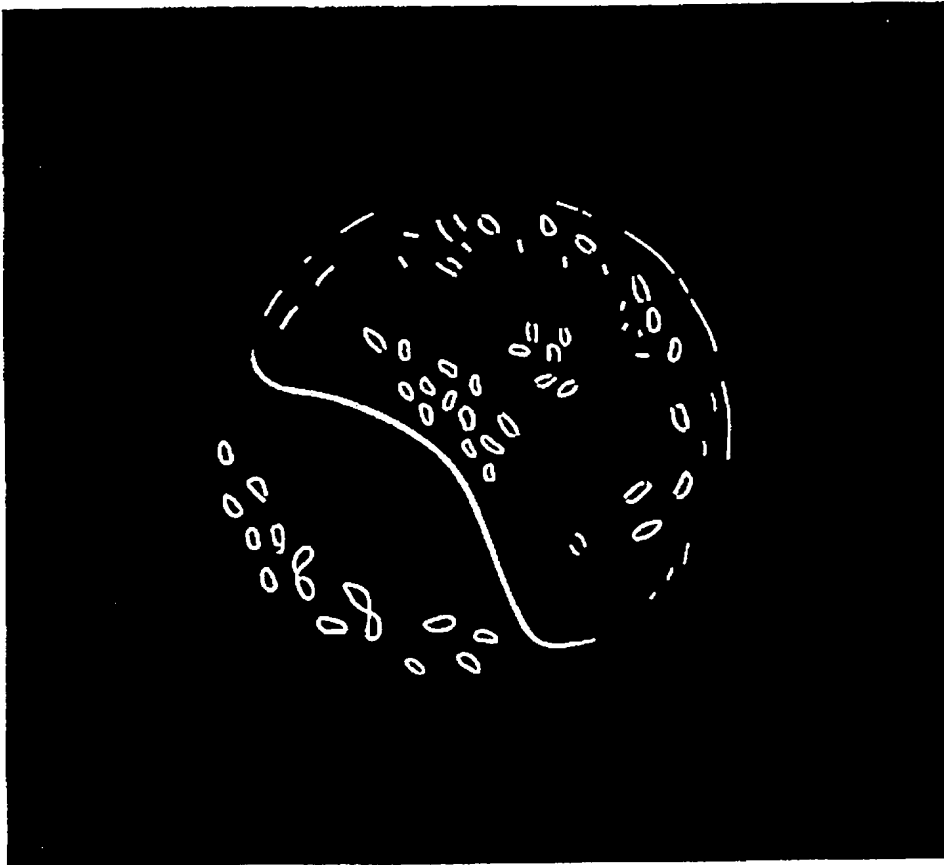
[図14]



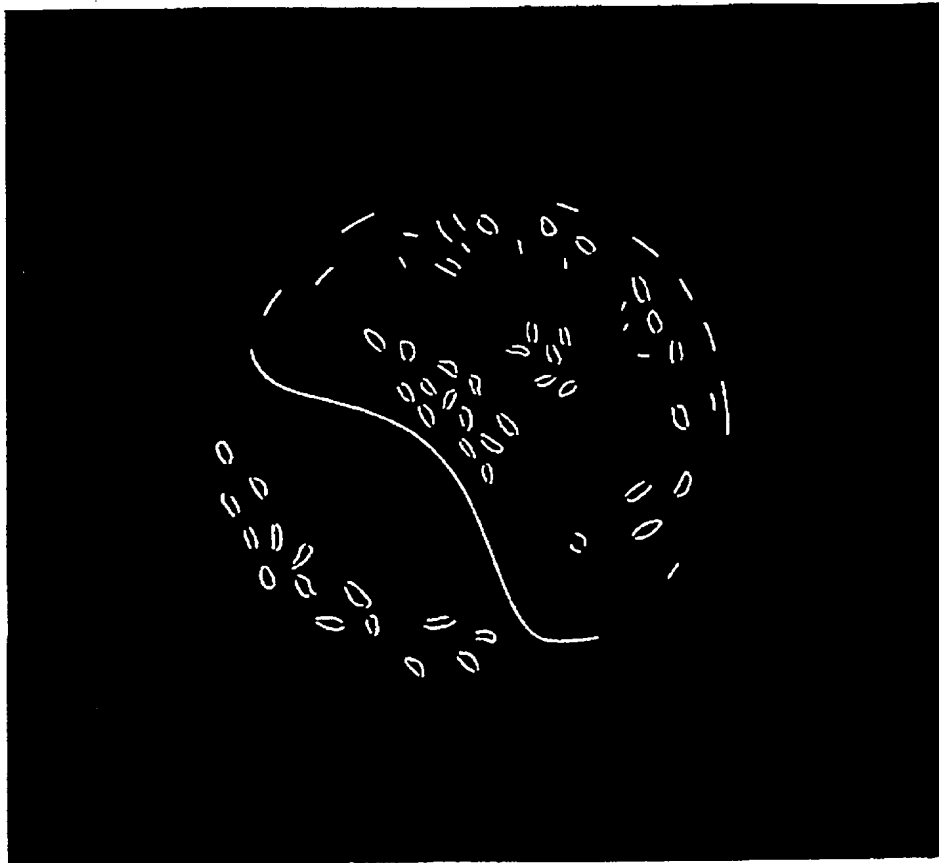
[図15]



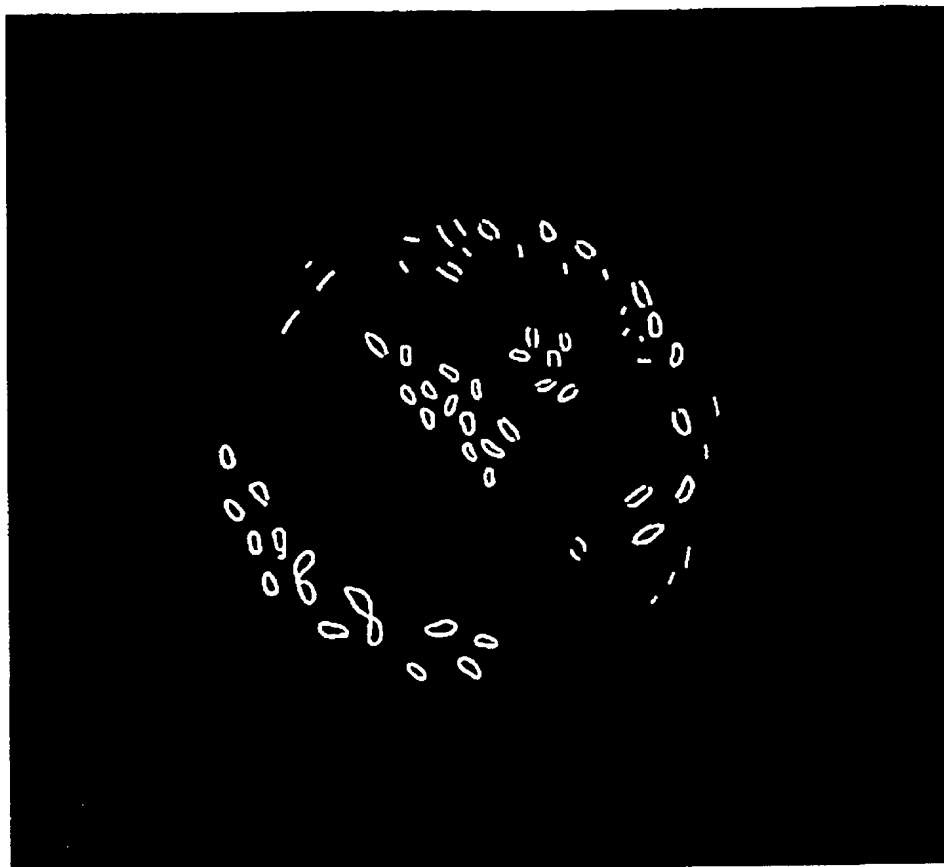
[図16]



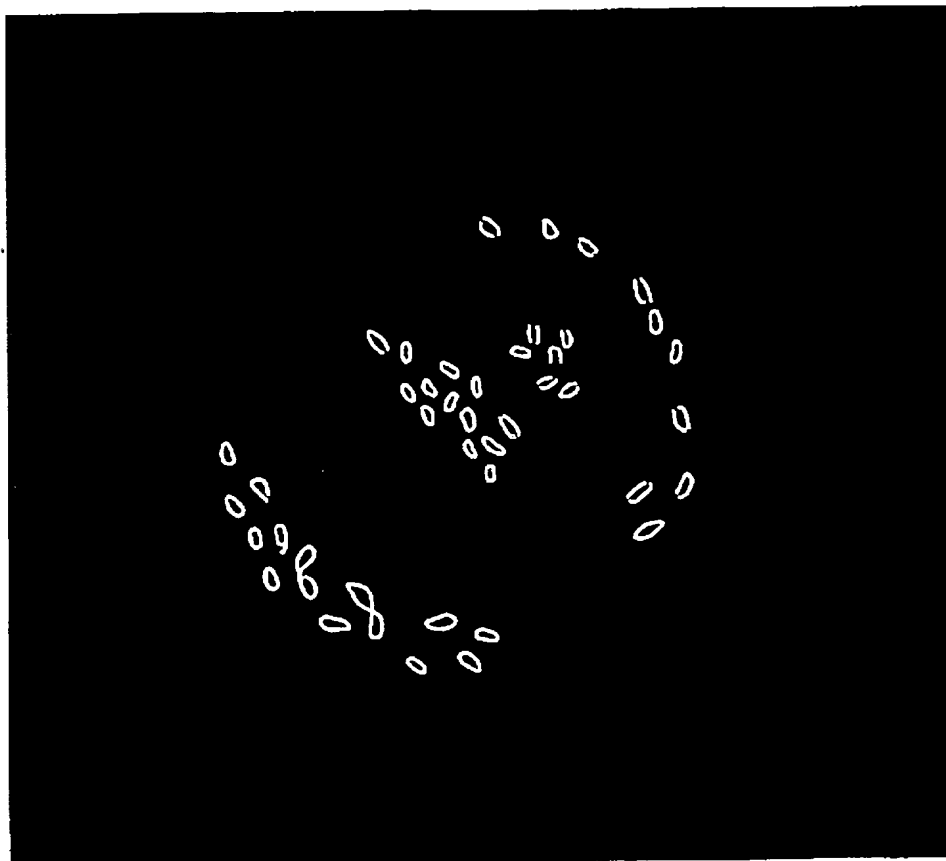
[図17]



[図18]



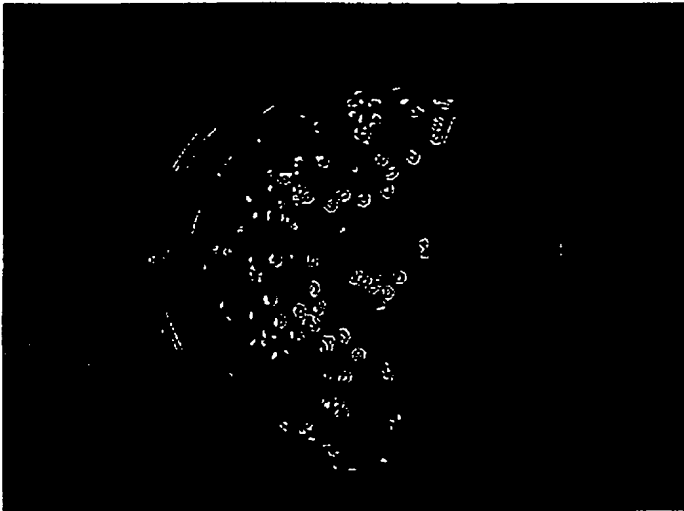
[図19]



[図20A]



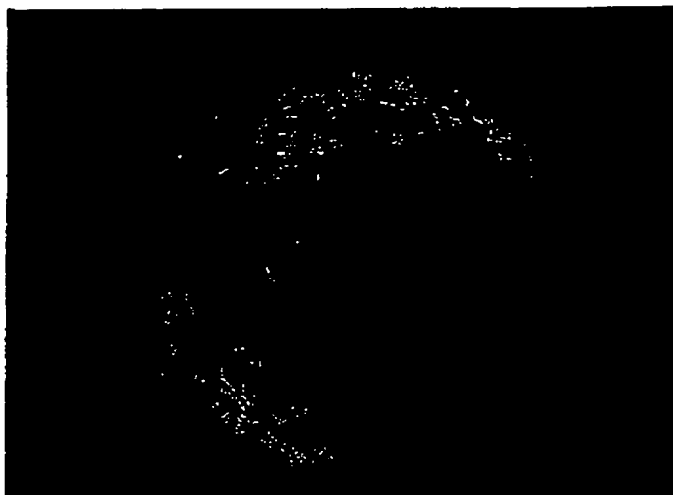
[図20B]



[図21A]



[図21B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/17(2006.01), G01N33/483(2006.01), G01N33/68(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/00-21/61(2006.01), G01N33/483(2006.01), G01N33/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, JMEDPlus(JOIS), JST7580(JOIS), JSTPlus(JOIS), MEDLINE(JDREAM),
Utility Model File(PATOLIS), PATENT FILE(PATOLIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Biotechnology and Bioengineering, Vol.86, No.4, 20 May, 2004 (20.05.04), pages 389 to 398	1, 3, 4, 6 2, 5
X Y	WO 2003/87326 A (Kendro Laboratory Products L.P.), 23 October, 2003 (23.10.03), Full text & JP 2005-520174 A	1, 3, 4, 6 2, 5
Y	JP 6-94595 A (Mitsui Mining & Smelting Co., Ltd.), 05 April, 1994 (05.04.94), Full text (Family: none)	2, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March, 2006 (16.03.06)

Date of mailing of the international search report
04 April, 2006 (04.04.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303569

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 3-150447 A (Nippon Steel Corp.), 26 June, 1991 (26.06.91), Full text (Family: none)	2, 5